

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer: **0 492 497 A2**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**(21) Anmeldenummer: **91121933.5**(61) Int. Cl. 5: **C12P 7/62, C12N 11/08**(22) Anmeldetag: **20.12.91**(30) Priorität: **24.12.90 DE 4041777**(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**01.07.92 Patentblatt 92/27**(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL**(71) Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**  
**Postfach 80 03 20**  
**W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)**(72) Erfinder: **Schudok, Manfred, Dr.**  
**Birminghamstrasse 89**  
**W-6230 Frankfurt am Main(DE)**Erfinder: **Fülling, Gerd, Dr.**  
**Drosselweg 3**  
**W-6230 Frankfurt am Main(DE)**Erfinder: **Kretzschmar, Gerhard, Dr.**  
**Ulmeweg 10**  
**W-6236 Eschborn 2(DE)**(54) **Verfahren zur Acylierung von Alkoholen mit einem immobilisierten Pseudomonas-Lipase**(57) **Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Acylierung von Alkoholen mit Pseudomonas-Lipasen, die an Träger auf Polystyrol- oder Phenol-Formaldehyd-Basis immobilisiert wurden.**

EP 0 492 497 A2

Optisch aktive Alkohole sind oftmals wichtige chirale Vorstufen von biologisch aktiven Substanzen, wie z.B. von Arzneimitteln, Naturstoffen, Pflanzenschutzmitteln oder auch von Flüssigkristallbausteinen.

Ein wirtschaftliches Herstellungsverfahren, welches die enzymatische Racematspaltung und damit die Darstellung der optisch aktiven Alkohole gewährleistet, ist deshalb von großer Bedeutung. Gleiches gilt für die enzymatische Stereodifferenzierung prochiraler Verbindungen, wie z.B. der Veresterung enantiotoper Hydroxylgruppen von 2-substituierten Propan-1,3-diolen. Außerdem ist die Acylierung mittels Enzymkatalyse, im Gegensatz zur chemischen Acylierung, für besonders empfindliche Substrate wie z.B. bestimmte primäre oder sekundäre Alkohole von Bedeutung.

Einige pharmakologische Wirkstoffe, deren Darstellung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erleichtert und wirtschaftlicher werden wird, sind Präparate wie NSAIDs (non-steroidal-antiinflammatory drugs), Betablocker, Bronchospasmolytika, Antimycotica, Pyrethroide, Tetramisol, Tetrahydrozolin, (R)-(-)-Toxometin und (S)-(+)-Fluoxetin sowie Prostaglandine und Kohlenhydrate. Chirale Bausteine zur Synthese von Protease-Inhibitoren, beispielsweise des Renins sind durch die Anwendung enzymatischer Verfahren erheblich einfacher zugänglich.

Es ist bereits bekannt, daß man Vinyl ester unter Hinzugabe von Alkoholen in Gegenwart von Lösungsmitteln, wie z.B. Tetrahydrofuran, unter enzymatischer Katalyse umestern kann (M. Degueil-Castaing et al. Tetrahedron Letters, Vol. 28, No. 9, Seiten 953-954, 1987). Als Enzym wurde Schweinepankreas-Lipase benutzt. Eine Stereoselektivität wurde nicht beobachtet.

Es ist außerdem die enzymatische Trennung von racemischen Alkoholen aufgrund einer selektiven enzymkatalysierten Umesterungsreaktion mit Vinyl estern in Abwesenheit von Lösungsmitteln bekannt. Als Enzyme dienen immobilisierte Lipasen aus Schweineleber und -pankreas sowie aus den Mikroorganismen Pseudomonas, Candida, Mucor, Rhizopus und Penicillium (EP 032 19 18).

Weiterhin ist bekannt, daß für die Umesterung Carbonsäureester (G. Carpani, F. Orsini, M. Sisti, L. Verotta, Gazz. Chim. Ital. 119, p. 463-465 (1989)) bzw. für die Acylierung cyclische Carbonsäureanhydride (Y. Terao et al., Chem. Pharm. Bull. 37, p. 1653-1655 (1989)) eingesetzt werden können.

In der europäischen Patentanmeldung EP 0 25 42 43 werden aus prochiralen Diolen durch Umsetzung mit Vinylacetat in Gegenwart von Hydrolasen chirale Verbindungen optisch rein dargestellt. Dies gelingt durch selektive Veresterung nur einer der beiden enantiotopen primären OH-Gruppen.

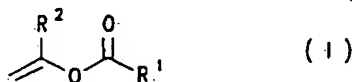
Es ist außerdem bekannt, daß Lipasen, bei der Hydrolyse und Umesterung von Fetten, Ölen und ähnlichen Verbindungen immobilisiert eingesetzt werden können (M. Mittelbach, J. Am. Oil Chem. Soc. 67, 168-170 (1990)).

Hsu et al. (Tetrahedron Letters, Vol. 31, No. 44, S. 6403-6406 (1990)) beschreiben die Umsetzung von sekundären Alkoholen mittels XAD-8 immobilisierter Lipase aus Pseudomonas und finden eine beschleunigte Umsetzung des Substrates. In der Publikation befinden sich jedoch keine Aussagen bezüglich der Standzeiten (Haltbarkeit) oder der Temperaturstabilität des fixierten Enzyms ohne nennenswerten Aktivitätsverlust.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß die O-Acylierung von Alkoholen mit Hilfe von immobilisierter Pseudomonas-Lipase besonders effektiv durchgeführt werden kann, indem man das Enzym mittels Bindung an hydrophobe Träger, wie Adsorberharze auf Polystyrolbasis immobilisiert.

Die Erfindung betrifft somit:

Ein Verfahren zur Acylierung von Alkoholen, wobei man einen Vinyl ester der Formel I



in der

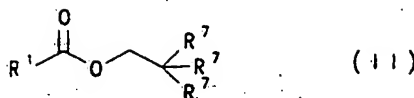
R<sup>1</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, welches gegebenenfalls mit Halogen substituiert ist, Phenyl oder (C<sub>3</sub>)-Alkoxy-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl

und

R<sup>2</sup> Wasserstoff oder Methyl bedeutet,

oder

einen Carbonsäureester der Formel II



5 in der R<sup>1</sup> die oben genannte Bedeutung hat und R<sup>7</sup> entweder Fluor, Chlor oder Wasserstoff bedeutet, wobei alle R<sup>7</sup> identisch sein müssen oder R<sup>7</sup> ist Fluor, Chlor, Brom oder Cyan und Wasserstoff, wobei zwei R<sup>7</sup> Wasserstoff bedeuten müssen oder R<sup>7</sup> bedeutet Fluor oder Chlor und Wasserstoff, wobei nur ein R<sup>7</sup> Wasserstoff ist und die beiden anderen Substituenten identisch sind,

10 oder

eines der cyclischen Carbonsäureanhydride Bernsteinsäure- oder Glutarsäureanhydrid in Gegenwart von immobilisierter Pseudomonas-Lipase mit einem Alkohol umgesetzt, das dadurch gekennzeichnet ist, daß Pseudomonas-Lipasen, die an Adsorberharze auf Polystyrolbasis immobilisiert sind, eingesetzt werden.

15 Im folgenden wird die Erfindung detailliert beschrieben, insbesondere in ihren bevorzugten Ausführungsformen. Ferner wird die Erfindung durch den Inhalt der Ansprüche bestimmt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird der als Lösemittel dienende oder in einem anderen organischen Lösemittel gelöste Vinyl- bzw. Methylvinylester bzw. der Carbonsäureester der Formel II oder das cyclische Carbonsäureanhydrid in ein Keton, Aldehyd oder Alkohol und einen Acylrest gespalten und letzterer mit dem hinzugegebenen Alkohol (Substrat) enzymatisch acyliert wird.

20 Als Trägermaterialien sind Adsorberharze auf Polystyrolbasis geeignet. Alle Träger sind handelsüblich erhältlich.

Die verwendeten Trägermaterialien auf Polystyrolbasis besitzen ein Porenvolumen von 25-70, vorzugsweise aber 35-55 %, eine Oberfläche von 100-1000 m<sup>2</sup>/g, vorzugsweise aber 200-750 m<sup>2</sup>/g, sowie einen Porendurchmesser von 25-1300 Å, vorzugsweise 50-250 Å.

25 Als Enzym werden Pseudomonas-Lipasen [Lipase P aus Pseudomonas cepacia (auch als FP oder PS bezeichnet) Amano Pharmaceuticals, Nagoya, Japan] eingesetzt.

Zur Immobilisierung des Enzyms werden pro 10 ml Träger 0,01 bis 2 g, bevorzugt jedoch 0,1-1,5 g Enzym in 0,005-1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 5-9, bevorzugt jedoch pH 6-8, für 1-20 Std. gerührt. Der Puffer wird nach der Reaktionszeit über eine Fritte abgesaugt und das Enzym-Träger-Gemisch mit großen Mengen Wasser, Aceton und Vinylacetat gewaschen. Der Träger ist in diesem Zustand gebrauchsfertig und kann in trockenem Zustand gelagert werden.

Die mit Enzym zu belegende Trägermenge wird in Abhängigkeit von der Größe des Ansatzes, von der Reaktivität des Alkohols, von der zu erwartenden Reaktionszeit und von der gewünschten Umsatzhöhe frei gewählt. Sie kann durch Vorversuche leicht bestimmt werden.

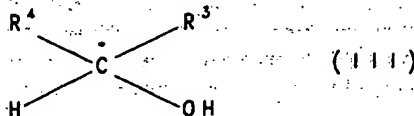
Die Vinyl- bzw. Methylvinylester der Formel I sind, sofern nicht käuflich, auf einfache Weise herstellbar; beispielsweise durch Edelmetall-katalysierte Umesterung von Vinylacetat mit den entsprechenden Carbonsäuren. Vorzugsweise wird die Umesterung durch Pd<sup>2+</sup> katalysiert.

Die Vinylester können außerdem noch durch eine Hg<sup>2+</sup>-katalysierte Addition von Acetylen synthetisiert werden.

Die Carbonsäureester der Formel II sind ebenso wie die cyclischen Carbonsäureanhydride (Bernsteinsäure- und Glutarsäureanhydrid) käuflich oder nach Standardverfahren herzustellen.

Die Alkohole erhält man, sofern sie nicht käuflich sind, z.B. durch Reduktion aus den entsprechenden Ketonen, die meist käuflich sind, oder durch α-Halogenierung entsprechender Ketone mit anschließender Reduktion zum Alkohol. Andere nicht käufliche Alkohole oder Ketone lassen sich nach literaturbekannten Verfahren einfach herstellen; beispielsweise über Grignard- oder andere gängige Additionsreaktionen.

45 Unter Alkoholen versteht man einen Alkohol der Formel III:



55 in der R<sup>3</sup> C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl oder C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-Cycloalkyl bedeutet, wobei diese Reste auch halogensubstituiert sein können, und

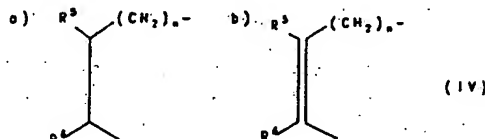
R<sup>4</sup> Epoxy-C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkyl bedeutet, wobei die Epoxy-Gruppe in  $\beta$ -Position zur OH-Gruppe im Rest der Formel II steht

oder

R<sup>4</sup> C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenyl, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkynyl, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkenyl, wobei die Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl- und Cycloalkenylreste gegebenenfalls mit COOH, Halogen, NO<sub>2</sub>, CN, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy-carbonyl oder Phenyl substituiert sind, wobei der Phenylrest seinerseits mit Halogen, NO<sub>2</sub>, CN oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy substituiert sein kann, oder R<sup>4</sup> Aryl oder Heteroaryl bedeutet, wobei die Aryl- oder Heteroarylreste gegebenenfalls mit C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy, Halogen, NO<sub>2</sub>, CN oder N Sgr. substituiert sind, wobei Sgr eine Aminoschutzgruppe darstellt;

oder in der

R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> zusammen eine Alkyl- oder Alkenyl-Rest der Formel IVa, b



darstellen, in der

n = 1, 2 oder 3 ist und

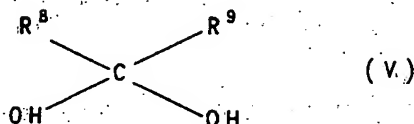
R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-Alkenyl, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl oder

R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> zusammen anelliertes Phenyl oder anelliertes Naphthyl bedeuten, wobei der Phenyl- oder Naphthyl-Rest gegebenenfalls C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy, NO<sub>2</sub>-, CN- oder Halogen-substituiert ist,

wobei eine Methyleneinheit der Alkenylkette auch durch eine Carbonylgruppe ersetzt sein kann,

oder

einen Alkohol der Formel V



in der

R<sup>8</sup> Wasserstoff oder eine Alkylgruppe und

R<sup>9</sup> Alkyl, Alkyl, Aryl, Benzyl oder eine Naphthylmethylgruppe

bedeuten.

Es können außerdem alle höherwertigen Alkohole als Substrat eingesetzt werden.

Unter Halogenen des Alkohols der Formel III werden Fluor, Chlor, Brom und Jod, insbesondere Chlor und Brom verstanden. Unter "Aryl" werden beispielsweise Phenyl, Naphthyl, Phenanthryl, Anthryl und Fluorenyl verstanden, insbesondere Phenyl, Naphthyl und Phenanthryl. Unter "Heteroaryl" werden beispielsweise Furyl, Thienyl, Pyrrolyl, Pyridyl, Pyrimidyl, Pyrazinyl, Pyridazinyl, Pyrazolyl, Isoxazolyl, Thiophenyl, Imidazolyl, Oxazolyl, Thiazolyl und Indolyl verstanden, insbesondere Furyl, Thienyl, Pyrrolyl und Pyridyl. Unter der Aminoschutzgruppe "Sgr." werden die in der Peptidchemie üblicherweise eingesetzten Aminoschutzgruppen verstanden, beispielsweise Benzyloxycarbonyl (Z), Benzoyl, Benzyl, Butyloxycarbonyl (Boc), 9-Fluorenyl-methoxycarbonyl (Fmoc), Benzhydryl, Allyloxycarbonyl (Aloc), Tosyl, Methoxymethyl (MOM), Tetrahydropyranyl (THP), Acetyl, aber auch Alkyl- oder Cycloalkylgruppen, wie beispielsweise N-Methyl- oder N,N-Dimethyl. Unter "anelliertem Phenyl" bzw. "anelliertem Naphthyl" wird ein Phenyl- bzw. Naphthylrest verstanden, bei dem die C-C-Doppelbindung des Restes der Formel III Bestandteil des Phenyl- bzw. Naphthylrestes ist. Die gegebenenfalls substituierten Reste R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> sind bevorzugt monosubstituiert.

Alkyl- und Alkenylreste mit 3 und mehr Kohlenstoffatome und Alkynylreste mit 4 und mehr Kohlenstoffatomen können sowohl geradkettig als auch verzweigt sein.

Der zu acylierende Alkohol wird in Konzentration von 0,05-200 %, vorzugsweise 0,5-10 %ig - bezogen auf das Volumen des Vinylesters - eingesetzt.

Für die Acylierung des Alkohols sind mindestens 0,5 Moläquivalente des Vinylesters einzusetzen.

Die Umsetzung der Alkohole erfolgt "batchweise" oder im kontinuierlichen Verfahren.

Die Racematspaltung der Alkohole kann beim erfindungsgemäßen Verfahren mit einer Aktivitätserhöhung von mindestens 90 % verglichen mit herkömmlichen Verfahren durchgeführt werden.

Das trägerfixierte Enzym zeigt im kontinuierlichen Verfahren selbst nach einigen Monaten der Verwendung, wobei sich Reaktionsläufe und Phasen der Nichtbenutzung des fixierten Enzyms abwechseln, kaum Aktivitätsverlust. Dies gilt auch, wenn die Reaktion bei erhöhten Temperaturen durchgeführt wird.

Für die "batchweise"-Umsetzung mit immobilisierter *Pseudomonas*-Lipase wird der Vinylester der Formel I, bzw. der Carbonsäureester der Formel II oder das cyclische Carbonsäureanhydrid, vorzugsweise jedoch Vinylacetat oder eine Lösung des Vinylesters, in einem (unpolarem) organischen Lösemittel vorgelegt und der umzusetzende Alkohol hinzugegeben. Als Lösemittel eignen sich vorzugsweise Ether, ganz besonders jedoch symmetrische und unsymmetrische, verzweigte und nicht verzweigte Dialkylether. Außerdem eignen sich vorzugsweise Kohlenwasserstoffe, ganz besonders lineare, verzweigte oder cyclische Kohlenwasserstoffe von C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>. Zu dieser Suspension gibt man trägerfixierte *Pseudomonas*-Lipase und rührt oder schüttelt bei konstanter Temperatur. Die Beendigung der Reaktion wird mittels DC, GC oder HPLC kontrolliert. Anschließend filtriert man das fixierte Enzym ab, wäscht gut mit einem Lösemittel (s.o.) oder Vinylacetat nach und dampft die Lösung im Vakuum ein. Das im Fall der Racemattrennung als Rückstand verbleibende Alkohol-/Ester-Gemisch wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel oder durch Extraktion, Kristallisation oder Destillation getrennt. Andere Acylierungsprodukte fallen häufig in ausreichender Reinheit an, so daß sich eine Aufreinigung erübrigt.

Zur Durchführung der Reaktion im kontinuierlichen Verfahren packt man die trägerfixierte *Pseudomonas*-Lipase P/FP/PS in eine Glassäule und spült mit dem Lösemittel, in dem die Reaktion durchgeführt wird, d.h. mit Vinylacetat, einem anderen Vinylester oder einem anderen organischen Lösemittel.

Anschließend läßt man die Substratlösung mit konstanter Geschwindigkeit bei konstanter Temperatur durchlaufen.

Das Verhältnis von Träger [ml] zu fixierter Lipase [g] zu Vinylacetat [ml] zur Konzentration des Substrats [Vol-%] liegt im Bereich 5-100:1:5-10.000:0,5-200, wenn Vinylacetat (d.h. ohne weiteren Lösemittelzusatz) eingesetzt wird.

Wird die Reaktion in einem Vinylester durchgeführt, setzt man den zu acylierenden Alkohol in Konzentrationen von 0,05 - 200 Vol-% ein.

Die Höhe des Umsatzes kann nahezu beliebig durch Einstellen der Tropfgeschwindigkeit gesteuert werden und ist durch Vorversuche leicht zu bestimmen.

Die Raum-Zeit-Ausbeuten sind direkt von den Absolutwerten der oben genannten Parameter abhängig, besonders aber von der Säulendimensionen, d.h. der Enzymmenge, die trägerfixiert in der Säule vorgelegt wird.

Die Säulendimension ist frei wählbar, liegt im Labormaßstab jedoch vorzugsweise in einer Größenordnung von 10-500 ml. Bei einer bevorzugten Säulenbefüllung mit 50 ml trägerfixiertem Enzym, einer 1 %igen Substratlösung und einer Durchlaufgeschwindigkeit von 10 Tropfen/Min. werden Raum-Zeit-Ausbeuten von etwa 0,5-300 g/l/h erzielt.

Die Reaktionstemperatur während des Verfahrens beträgt (-) 10 bis (+) 100 °C, vorzugsweise (+) 0-60 °C.

Die Reaktionszeiten sind abhängig von der Art des umzusetzenden Alkohols, dessen Konzentration sowie der Menge des trägerfixierten Enzyms und schwanken zwischen 1 Std. und 4 Wochen. Vorzugsweise liegen sie zwischen 3 Std. und 3 Tagen.

Die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren entstehenden Produkte Acetaldehyd bzw. Aceton bzw. die für die Acylierung freigesetzten Alkohole sowie die im Falle der selektiven Acylierung entstehenden enantiomeren Alkohole (Substrate), d.h. Carbonsäureester und nicht umgesetzter Alkohol lassen sich auf bekannte Art und Weise durch Anwendung aller, aber im Einzelfall zu prüfender, üblicher Methoden trennen, vorzugsweise durch Chromatographie an Kieselgel oder eines der anderen, oben erwähnten Verfahren.

#### Beispiel

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift

Zur Immobilisierung des Enzyms wird das Trägermaterial entweder

a) unbehandelt eingesetzt,

b) nach der Enzymimmobilisierung mit Glutardialdehyd nachvernetzt (Tab. 1)

zu a) Für die Fixierung der Lipase am Träger werden 50 ml des Trägers in 100 ml K-Phosphatpuffer, pH 7,0, suspendiert und mit 500 mg Lipase P versetzt. Man rührt für 3 h bei RT, filtriert ab und wäscht gut mit Wasser nach.

zu b) Nachvernetzung

Zur Nachvernetzung wird wie unter a) beschrieben verfahren, jedoch nach der angegebenen Fixierungszeit mit 4 ml Glutardialdehydlösung (25 %ig) vernetzt. Nach 1 Stunde wird das trägerfixierte Enzym abfiltriert und mit Wasser nachgewaschen.

Die bevorzugten Träger können wie folgt charakterisiert werden:

	⊗XAD-2	⊗XAD-4
Porenvolumen [%]	42	51
Dichte	1,02	1,02
Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	330	750
Porendurchmesser [Å]	90	50

Der Träger wird in Wasser oder trocken aufbewahrt.

500 mg des umzusetzenden Alkohols werden in 20 ml Vinylacetat suspendiert. Dazu gibt man die immobilisierte Lipase und rührt bei konstanter Temperatur.

Nach Beendigung der Reaktion filtriert man das immobilisierte Enzym ab. Die verbleibende Lösung wird im Vakuum vollständig eingeeengt.

Die im Rückstand befindlichen Acylierungsprodukte können durch Standardverfahren, beispielsweise durch Kieselgelchromatographie, getrennt werden.

In Tabelle 2 sind die Ausgangs- sowie die erhaltenen Produkte, die variablen Verfahrensparameter (Enzymmenge, Trägermenge, Alkoholmenge, Vinylestermengen, Reaktionstemperatur, Reaktionszeit) sowie Produktcharakteristika und chemische Ausbeute angegeben.

Zur exakten Bestimmung der Aktivität ist es notwendig, die an den Träger gebundene Enzymmenge genau zu bestimmen.

Man geht bei den hier dargestellten Versuchen für das erfindungsgemäße Verfahren von der Voraussetzung aus, daß Pseudomonas-Lipase ein einheitliches Protein mit einem Salzgehalt von 37 % bzw. 63 % Protein (Gewichts-%) ist. Dieser Salzgehalt wird durch Dialyse bestimmt.

Für die Bestimmung der Fixierungsausbeute macht man den schon beschriebenen Versuch mit einem Ansatz von 20 ml XAD-2 Träger und 2 g Pseudomonas-Lipase. Die Fixierungs- und Waschlösung werden gesammelt, vereinigt und lyophilisiert. Aus diesem Pool erhält man 1,77 g Rückstände, bestehend aus Enzym und Puffersalzen. Durch Auswaage nach dem Lyophilisieren von reinem Puffer ist eine Salzmenge von 0,38 g in der Menge der eingesetzten Pufferlösung bekannt.

Somit sind von den 1,77 g Rückstand zum einen 0,38 g Puffersalze und zum anderen 0,74 g Salze des Enzyms (= 37 %; s.o.) abzuziehen.

Die verbleibende Menge von 0,65 g sollte der nicht fixierten Enzymmenge entsprechen.

Eine nachfolgende Dialyse des Rückstandes zeigt, daß noch eine geringe Salzmenge enthalten ist, so daß 0,58 g Enzymmenge statt des theoretischen Wertes von 0,65 g verbleiben.

Somit liegt die fixierte Enzymmenge zwischen 0,61 und 0,68 g. Daraus folgt, daß die Fixierungsausbeute 51 % beträgt.

Die Berechnung wird nochmals beispielhaft für das in Tabelle 2 genannte Beispiel 1 (Phenylethanol) durchgeführt.

50 mg Lipase P (käuflich erworben)

x 0,63 tatsächlicher Enzymgehalt Lipase P

x 0,51 Fixierungsausbeute

⇒ 16 mg trägerfixierte Lipase

50 mg freie Lipase P

x 0,63 tatsächlicher Enzymgehalt Lipase P

⇒ 31,5 mg Lipase P tatsächlicher Enzymgehalt

16 mg fixiertes Enzym liefern 33,4 % Umsatz.

31,5 mg freies Enzym liefern 20,7 % Umsatz.

⇒ Aktivität: 320 %

Die enzymatische Racematspaltung kann nicht nur, wie oben beschrieben, in Anwesenheit von Vinylacetat, sondern auch in Anwesenheit anderer Vinylester, wie z. B. von Chloressigsäure, Laurinsäure und Phenyllessigsäure erfolgen. Hierfür wird Träger-fixierte Lipase P in eine Glassäule gef llt und mit 150 ml t-Butylmethylether, der als Lösemittel für die folgende Umsetzung dient, durchspült.

Anschließend beschickt man die Säule mit einer Lösung von Substrat und Vinylester, die in jeweils 250 ml t-Butylmethylether gelöst sind. Diese Lösung läßt man die Säule langsam durchlaufen und bestimmt die Zusammensetzung nach vollständiger Passage der Lösungen mittels Gaschromatographie.

Die einzusetzenden Mengen, sowie die Durchlauf- und Reaktionszeiten und die Ergebnisse sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Beispiel für die Umesterung mit Essigsäureethylester:

0,5 ml Essigsäureethylester werden mit 2,5 %igem Phenylethanol in t-Butylmethylether (10 ml) und 5 ml XAD-2 fixiertem Enzym (theoret. Enzymmenge: 50 mg) bei Raumtemperatur gerührt.

Die Reaktion zeigte einen 50 %igen Umsatz des Phenylethanol nach 5 Tagen.

Die Kontrolle mit nicht fixiertem Enzym ergab nach 7 Tagen einen deutlich geringeren Umsatz.

Der Umsatz wurde mittels DC bestimmt.

Beispiel für die Veresterung primärer OH-Gruppen:

2,5 %iges Geraniol werden in 10 ml Vinylacetat gelöst und unter Zusatz von 5 ml XAD-2 fixiertem Enzym (theoret. Enzymmenge: 50 mg) bei Raumtemperatur gerührt.

Eine quantitative Acetylierung war mit fixiertem Enzym bereits nach 1 Std. durchgeführt, während das freie Enzym 50 % mehr Zeit benötigte.

Beispiel für die Acetylierung von dl-Pantolacton -- Test der Langzeitstabilität bei erhöhter Temperatur im kontinuierlichen Verfahren:

400 ml XAD-2-fixierte Lipase P wird in eine temperierbare Doppelmantel-Glassäule gepackt. Eine 0,1 %ige Lösung von dl-Pantolacton (in Vinylacetat/t-Butylmethylether 1:9; Gesamtvolumen 2 l) wird bei 50 ° C mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,11 ml/min über die Säule gegeben. Zur Kompensation des S ulenvolumens wird anschließend mit gleicher Geschwindigkeit mit t-Butylmethylether nachgespült. GC-Analyse der Reaktionslösung ergibt in diesem ersten Durchlauf einen Umsatz zu Pantolactonacetat von 71,6 %. Die gespülte Säule wird bei RT im trockenen Zustand aufbewahrt und jeweils 5 h vor erneutem Beginn eines weiteren Durchlaufs temperiert. Auf diese Art und Weise werden innerhalb der nächsten 5 Monate noch 11 weitere kontinuierliche Umsetzungen durchgeführt. Der 12. Lauf (unter identischen Bedingungen,

außer: Durchflußgeschwindigkeit 0,13 ml/min), 5 Monate später durchgeführt, zeigt einen Umsatz zu Pantolactonacetat von 70,7 %.

Tabelle 1: Die Reaktionszeit beträgt jeweils 6 Std.

Bsp. Nr.	Träger	mit Chlor-essigsäure vorfunkt.	mit Glutar-dialdehyd nachvernetzt	% Umsatz zu Acetat				Einsatz-menge
				1. Lauf	2.	3.	4.	
1	®Amberlite XAD-2	-	-	33,4	38,4	38	33,5	(X)
2	XAD-4	-	-	19,35	11,94	12,31	8,08	
	XAD-16	-	-	17,20	14,11	14,91	10,06	
	XAD-1180	-	-	17,61	13,03	12,71	11,19	
3	XAD-12	-	-	19	4,45	-	-	
4	XAD-2	-	ja	18,45	24,93	17,31	13,46	
5	XAD-4	-	ja	15,66	16,74	14,63	11,91	
6	XAD-12	-	ja	26,06	9,7	-	-	
7	®DEAE-Sephadex	-	-	11,03	-	-	-	dto.
8	"	-	ja	12,58	-	-	-	
9	/Sephacel	-	-	7,03	-	-	-	
10	"	-	ja	8,55	-	-	-	
11	®Celite	-	-	10,98	-	-	-	
12	®Duolite A7	-	ja	25,96	12,7	12,65	-	
13	®"A 368"	-	-	41,13	5,61	5,5	-	

(x) In Bsp. 1 wurden verwendet: 250 mg Phenylethanol, 10 ml Vinylacetat, 5 ml Träger

Tabelle 2 (Als Träger wurde jeweils Amberlite XAD-2 verwendet)

Bsp. Nr.	racemo- prochir. Alkohol	Edukt Menge	Konz.	Menge Träger		Enzym		Temp.	Menge Vinyl- ester	Reaktions- zeit	Um- satz	Akt
		[g]	in %	[ml]	A:	[g]	B:	[°C]	[ml]	[h]	[%]	[%]
1	1-Phenyl- ethanol	A: 0,25 B: 0,25 C: 0,5	2,5 2,5 1	5 50	0,05 0,05 5			RT RT RT	10 10 50	6 6 -	33,4 20,7 50	320 - -
2	1-Phenyl- propanol	A: 0,50 B: 0,52 C: -	2,5 2,5 -	10 -	1 1 -			RT RT RT	20 20 -	30 30 -	46,1 37,1 -	250 - -
3	2-Chlor-1- phenylethanol	A: 0,51 B: 0,51 C: 0,5	2,5 2,5 0,2	10 50	1 1 5			RT RT RT	20 20 50	48 48 -	51,7 32,3 34	320 - -
4	Pantolacton	A: 0,5 B: 0,49 C: 0,5	2,5 2,5 0,2	10 50	1 1 5			RT RT 50°C	20 20 250	48 48 -	32,2 29,7 42	220 - -
5	Allethrolon	A: 0,5 B: 0,51 C: 0,5	2,5 2,5 1	10 50	1 1 5			RT RT RT	20 20 500	4 4 -	45 42 64	210 - -

Fortsetzung Tabelle 2

Bsp. Nr.	racemo: prochir. Alkohol	R-Z- Ausbeute [g/l/h]	Alkohol		Acetat		chem. Aus- beute
			ee	25 α <sub>D</sub>	ee	25 α <sub>D</sub>	
1	1-Phenyl- ethanol	-	n. b.	n. b.	> 95 %	+105,6	n. b.
		-	"	"	> 95 %	+105,1	n. b.
		3	> 95 %	-44	> 95 %	104,1	44 %
2	1-Phenyl- propanol	-	77 %	-38	> 95 %	102,7	36 %
		-	55 %	-27,4	> 95 %	+100,1	33 %
		-	-	-	-	-	-
3	2-Chlor-1 phenylethanol	-	n. b.	n. b.	> 95 %	+75,6	39 %
		-	n. b.	n. b.	> 95 %	-	25 %
		0,5	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
4	Pantolacton	-	n. b.	n. b.	> 95 %	+12,7	22 %
		-	n. b.	n. b.	> 95 %	+12,7	28 %
		0,5	n. b.	n. b.	> 95 %	+11,4	37 %
5	Allethrolon	-	> 95 %	+14,5	> 84 %	-27,6	44 %
		-	> 95 %	+14,8	92 %	-29,9	41 %
		6	> 95 %	+14,6	52 %	-15,87	63 %

Fortsetzung Tabelle 2

Bsp. Nr.	racemo: prochir. Alkohol	Edukt		Konz.	Menge		Temp.	Menge Vinyl- ester	Reaktions- zeit	Um- satz	Akt.
		Menge [g]	in %		A: Träger	B: Enzym					
					[ml]	[g]	[°C]	[ml]	[h]	[%]	[%]
6	1- (6-Acetoxy)	A: -	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	naphthyl-	B: -	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ethanol	C: 14	1	50	5	RT	RT	1400	-	52	-
7	2-(1-Naphthyl)-	A: 1	2	2,5	0,25	0°C	0°C	50*	16	98	190
	methyl)-prop-	B: 1	2	0,25	0,25	0°C	0°C	50*	16	95	-
	an-1,3-diol	C: 1	0,5	50	5	15°C	15°C	200*	6	n. b.	-

A = "Batch"-Versuch mit immob. Enzym

B = Vergleichsansatz mit freiem Enzym

C = Versuch im kontinuierlichen Verfahren

RT = Raumtemperatur

n. b. = nicht bestimmt

\* verwendet wurde Gemisch Vinylacetat/Dimethoxyethan/Diethylether

Bsp. Nr.	racemo: prochir. Alkohol	R-2- Ausbeute [g/l/h]	Alkohol		Acetat		chem. Aus- beute	chem. Aus- beute
			ee	25 α <sub>D</sub>	ee	25 α <sub>D</sub>		
6	1- (6-Acetoxy) naphthyl- ethanol	- - 3	- - > 95 %	- - -30	- - 92 %	- - + 82,35	- - 45 %	- - 48 %
7	2- (1-Naphthyl- methyl)-prop- an-1,3-diol	- - 30	- - -	- - -	95 % 97 % 88 %	+ 39,5 + 40,3 + 36,5	- - -	94 % 91 % n. b.

ee: gemessen nach Drehwert

**Tabelle 3: Acylierung von Phenylethanol in unterschiedlichen Vinylestern**

Bsp. Nr.	rac. + Alkohol [g]	Vinylester		Menge Enzym/Träger *	Reaktionszeit [h]	Umsatz (%)
		Art	Menge [ml]			
1	2,5 g	Chloressigsäure	12,5	5/50	5	67,6
2	2,5 g	Laurinsäure	5	5/50	5	41,7
3	2,5 g	Phenyllessigsäure	5	5/50	16	24,4

\* Als rac. Alkohol wurde jeweils Phenylethanol eingesetzt.

\* Als Träger wurde jeweils Amberlite XAD-2 eingesetzt.

Das erfindungsgemäße Verfahren weist gegenüber herkömmlichen Verfahren zur Racematspaltung von Alkoholen folgende Vorteile auf:

- A) Durch erhöhte Enzymaktivität sind die Raum-Zeit-Ausbeuten deutlich erhöht.
- B) Sehr hohe Standzeiten des fixierten Enzyms erlauben einen besonders wirtschaftlichen Einsatz des Biokatalysators.
- C) Die Aktivität des Enzyms ist dauerhaft (Tab. 1; s.u. (a)).
- D) Hohe Temperaturstabilität des fixierten Enzyms. 10 ml 0,5 %ige Phenylethanollösung in Toluol wird mit 100 mg freier Lipase bzw. 1 ml fixiertem Enzym und anschließend mit jeweils 0,1 ml Phenyllessigsäurevinylester versetzt. Die freie Lipase zeigt nach fünfständigem Rühren bei RT 3,2 % Umsatz bzw. nach gleichem Zeitablauf unter Rückfluß mit 110° C keine Aktivität mehr, während die fixierte Lipase bei 110° C noch 1-2 % Umsatz aufweist. Die Bestimmung des Umsatzes erfolgt per GC Test (Reoplex auf

©Chromosorb).

(a) 250 mg racem. Phenylethanol in 20 ml Vinylacetat wird mit 2 ml fixierten Lipase bei 50° C für 6 h geschüttelt. Anschließend wird der Umsatz per GC bestimmt, das fixierte Enzym abfiltriert und gut mit Vinylacetat nachgewaschen. Am nächsten Tag erfolgt eine erneute Umsetzung unter identischen Bedingungen.

(b) In gleicher Weise wird unter Verwendung von 0,2 g des freien Enzyms verfahren.

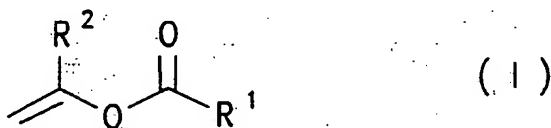
(a) Im 1. Durchlauf wird nach 6 h ein Umsatz von 48,7 % gemessen. Im 10. Durchlauf wird nach 6 h ein Umsatz von 21,2 % gemessen.

(b) Im ersten Durchlauf liegt der Umsatz nach 6 h bei 46,1 %. Nach dem 7. Durchlauf kein Produkt mehr nachweisbar.

Die Aktivität des Enzyms ist auf Dauer gewährleistet.

## Patentsprüche

1. Verfahren zur Acylierung von Alkoholen, wobei man einen Vinylester der Formel I,



in der

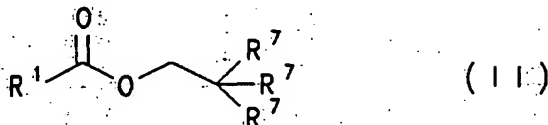
R<sup>1</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, welches gegebenenfalls mit Halogen substituiert ist, Phenyl oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl

und

R<sup>2</sup> Wasserstoff oder Methyl bedeutet,

oder

einen Carbonsäureester der Formel II



in der R<sup>1</sup> die oben genannte Bedeutung hat und R<sup>7</sup> entweder Fluor, Chlor oder Wasserstoff bedeutet, wobei alle R<sup>7</sup> identisch sein müssen oder R<sup>7</sup> ist Fluor, Chlor, Brom oder Cyan und Wasserstoff, wobei zwei R<sup>7</sup> Wasserstoff bedeuten müssen oder R<sup>7</sup> bedeutet Fluor oder Chlor und Wasserstoff, wobei nur ein R<sup>7</sup> Wasserstoff ist und die beiden anderen Substituenten identisch sind,

oder

eines der cyclischen Carbonsäureanhydride Bernsteinsäure- oder Glutarsäureanhydrid

in Gegenwart von immobilisierter Pseudomonas-Lipase mit einem Alkohol umgesetzt, das dadurch gekennzeichnet ist, daß Pseudomonas-Lipasen, die an Adsorberharze auf Polystyrolbasis immobilisiert sind, eingesetzt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung "batchweise" erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung im kontinuierlichen Verfahren erfolgt.

4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Trägermaterialien Adsorberharze auf Polystyrol-Basis mit einem Porenvolumen von 25 bis 75 %, einer Oberfläche von 100 - 1000 m<sup>2</sup>/g und einem Porendurchmesser von 25 - 1200 Å eingesetzt werden.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger

jeweils

a) unbehandelt zur Immobilisierung oder

b) nach Enzymankupplung mit Glutardialdehyd nachvernetzt, eingesetzt werden kann.

- 5 6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionstemperatur (-) 10 bis (+) 100° C beträgt.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionstemperatur 0 bis (+) 60° C beträgt.
- 10 8. Verwendung der gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 erhältlichen chiralen Bausteine zur Synthese von Protease-Inhibitoren.
- 15 9. Verwendung der gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 erhältlichen optisch reinen Alkoholen zur Herstellung von NSAIDs, Betablockern, Bronchospasmolytica, Antimycotica, Pyrethroiden, Tetramisol, Tetrahydrozolin, (R)-(-)-Tomaxetin, (S)-(+)-Fluoxetin, Prostaglandinen oder Kohlenhydraten.
- 20 10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die NSAIDs Ibuprofen und Naproxen, die Betablocker Nifenalol und Penbutolol, die Bronchospasmolytica Tolubuterol und Bitolterol, die Antimycotica Tioconazol und die Pyrethroide Allethrine sind.

25

30

35

40

45

50

55